

## KOMBINASI TERMOTERAPI DAN KHEMOTERAPI DENGAN KULTUR APEKS DAN MERISTEM UNTUK ELIMINASI VIRUS MOSAIK PADA TEBU

### *The Combined Treatment of Thermotherapy and Chemotherapy with Apex and Meristem Culture for Mosaic Virus Elimination in Sugarcane*

IKA ROOSTIKA <sup>1)</sup>, SEDYO HARTONO <sup>2)</sup>, dan DARDA EFENDI <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian  
Jl. Tentara Pelajar 3A Bogor-16111

<sup>2)</sup> Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada  
Jl. Flora 1 Bulaksumur Yogyakarta

<sup>3)</sup> Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor  
Jl. Merati, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

Email: ikatambunan@yahoo.com

Diterima: 15-12-2015; Direvisi: 3-2-2016; Disetujui: 24-2-2016

#### ABSTRAK

Aplikasi teknik termoterapi, khemoterapi, kultur apeks dan meristem merupakan cara untuk mengeliminasi virus. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh perlakuan termoterapi dan khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur apeks dan meristem untuk eliminasi virus mosaik pada tebu. Tahapan penelitian meliputi: (1) Deteksi virus dari tanaman induk, (2) Aplikasi termoterapi dengan suhu 50°C dan khemoterapi dengan Ribavirin 25 µg/l yang dikombinasikan dengan kultur apeks, (3) Aplikasi termoterapi dan khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur meristem, dan (4) Evaluasi eliminasi virus. Bahan tanaman yang digunakan adalah tebu varietas PS862 asal Cirebon (PS862-Crb), PS881 asal Surabaya (PS881-Sby) dan PSJK922 asal Bogor (PSJK922-Bgr). Deteksi virus dilakukan secara *Transmission Electron Microscopy* (TEM) dan *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Perlakuan termoterapi diberikan pada suhu 50°C dan perlakuan Ribavirin diberikan pada taraf 0 (kontrol) dan 25 µg/l. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan termoterapi atau khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur apeks tidak berhasil mengeliminasi virus. Sebaliknya kombinasi perlakuan khemoterapi dan kultur meristem terbukti berhasil mengeliminasi virus SCSMV pada varietas PS862-Crb, berdasarkan uji RT-PCR walaupun partikel *Potyvirus* masih terdeteksi berdasarkan uji TEM. Disarankan untuk melakukan indeksing dengan jumlah sampel yang lebih banyak untuk mengetahui tingkat keberhasilan eliminasi virus.

Kata kunci: *Saccharum officinarum* L., Ribavirin, *Potyvirus*, TEM, RT-PCR.

#### ABSTRACT

There are several ways to eliminate virus, such as the application of thermotherapy and chemotherapy technique, and also the apex and meristem culture. One way to control this disease is the use of virus-free seedlings. The objective of this study was to find out the effect of combined treatment between thermotherapy or chemotherapy with apex or meristem culture to mosaic virus elimination of sugarcane. There were four steps in this research: (1) Virus detection of mother plant, (2) Application of thermotherapy at 50°C and chemotherapy by using Ribavirin 25 µg/l combined with apex culture, (3) Application of thermotherapy and chemotherapy combined with meristem culture, and (4) Evaluation of virus elimination. The plant materials used were PS862 from Cirebon (PS862-Crb), PS881 from Surabaya (PS881-Sby) and PSJK922 (PSJK922-Bgr) from Bogor. Virus detection was conducted by TEM and RT-PCR analysis. The temperature for thermotherapy was 50°C and the

antiviral agent was Ribavirin (0 and 25 µg/l). The result showed that thermotherapy or chemotherapy combined with apex culture could not eliminate virus infection. The combined treatment of chemotherapy and meristem culture could eliminate SCSMV in variety PS862-Crb based on RT-PCR assay, however TEM analysis still detected the viral particle. It was suggested to undertake virus indexing of large number of samples to see the rate of virus elimination.

Keywords: *Saccharum officinarum* L., Ribavirin, *Potyvirus*, TEM, RT-PCR.

#### PENDAHULUAN

Salah satu penyakit penting pada tanaman tebu adalah penyakit mosaik (KRISTINI *et al.*, 2008). Efek utama dari infeksi virus mosaik adalah terhambatnya pertumbuhan batang sehingga tanaman mengalami penurunan produksi 20-30% (BAILEY, 2004). Pada tebu varietas PS864, penyakit mosaik dapat menurunkan potensi hasil sampai 22% (ASNAWI, 2009).

Salah satu penyebab penyakit mosaik pada tebu adalah patogen virus *sugarcane mosaic potyvirus* (SCMV). Pada tahun 2005, dilaporkan penyakit virus yang baru, yaitu *sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). Hasil survei menunjukkan bahwa penyakit SCSMV ditemukan pada semua pabrik gula dengan tingkat serangan 0.28-62.2% yang menyerang hampir semua varietas tebu komersial (PUTRA dan DAMAYANTI, 2009).

Tanaman tebu merupakan tanaman yang diperbanyak secara vegetatif sehingga virus dapat semakin terakumulasi dengan bertambahnya jumlah ratoon. Kegiatan ratoon dan bertambahnya siklus penanaman dengan menggunakan bahan tanaman yang sama dapat memperparah penyakit tersebut sehingga berdampak pada penurunan produksi. Salah satu cara pencegahan patogen virus yang efektif adalah dengan menggunakan benih bebas virus (HU *et al.*, 2012). Terdapat beberapa cara untuk mengeliminasi virus,

antara lain melalui aplikasi teknik termoterapi, khemoterapi, kultur apeks dan meristem.

Aplikasi *Hot Water Treatment* (HWT) pada bagal tebu dengan suhu 55°C selama 20-30 menit dilaporkan menyebabkan daya hidup yang rendah dan tingkat eliminasi virus yang kurang optimal, yaitu hanya mengurangi intensitas serangan virus SCSMV sebesar 9,1-9,9% (MAHARLIKA, 2009). Kultur meristem merupakan metode yang umum digunakan dalam mengeliminasi virus, namun memiliki daya regenerasi yang rendah (WANG dan VALKONEN, 2008; RAMGAREEB *et al.*, 2010; ALAM *et al.*, 2010; RETHEESH dan BHAT, 2010). Jenis virus tertentu juga sulit dieliminasi sehingga memerlukan tambahan perlakuan yang khusus atau kombinasi perlakuan tertentu, seperti termoterapi (WANG dan VALKONEN, 2012). Perubahan yang terjadi pada partikel virus ketika diberi perlakuan termoterapi terkait dengan lepasnya ikatan hidrogen dan disulfida pada protein kapsid yang diikuti dengan lepasnya ikatan kovalen fosfodiester asam nukleat yang berakibat pada kerusakan infektivitas virus dan penghambatan replikasi virus (PANATTONI *et al.*, 2013).

Pada penelitian sebelumnya, kendala *thermo shock* ketika perlakuan termoterapi dan pencoklatan (*browning*) telah dapat diatasi. WATI *et al.* (2014) melaporkan bahwa perlakuan termoterapi secara tidak langsung pada suhu 50°C dengan saringan merupakan metode yang paling optimal untuk mempertahankan kemampuan regenerasi apeks. Keberhasilan teknik kultur meristem ditentukan oleh kecilnya ukuran eksplan yang diisolasi, jenis tanaman, dan jenis virus. Ukuran eksplan yang terlalu kecil menyebabkan kendala teknis dalam proses regenerasi jaringan menjadi tanaman utuh atau planlet (WANG dan VALKONEN, 2012). Kendala teknis tersebut dapat diatasi dengan menggunakan senyawa antioksidan, seperti *polyvinylpyrrolidone* (PVP) dan *diethylthiocarbamic acid* (DIECA) yang ditambahkan dalam media tumbuh. Di sisi lain, ROOSTIKA *et al.* (2015) menyarankan menggunakan PVP 300 mg/l untuk menekan pencoklatan eksplan meristem tebu sehingga proses regenerasinya dapat terpacu. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perlakuan termoterapi dan khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur apeks dan meristem dalam mengeliminasi virus mosaik pada tebu.

## BAHAN DAN METODE

Tahapan penelitian meliputi: (1) Deteksi virus dari tanaman induk, (2) Aplikasi termoterapi dan khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur apeks, (3) Aplikasi

termoterapi dan khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur meristem, dan (4) Evaluasi eliminasi virus. Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah tebu PSJK992 asal Bogor (PSJK922-Bgr), PS862 asal Cirebon (PS862-Crb), dan PS881 asal Surabaya (PS881-Sby) yang dikoleksi di rumah kaca Unit Produksi Benih Unggul, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Balitbangtan), Bogor. Kegiatan kultur *in vitro* dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor. Uji *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan di Laboratorium Virologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta. Uji *Transmission Electron Microscopy* (TEM) dilakukan di Laboratorium Mikroteknik, Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta.

## Deteksi Virus dari Tanaman Induk

Deteksi virus dilakukan melalui dua cara, yaitu TEM dan RT-PCR. Sampel yang digunakan adalah daun muda. Prosedur TEM dilakukan dengan cara menggerus sampel yang telah diberi bufer fosfat. Setelah diinkubasi, sampel ditetaskan ke atas grid dan dibiarkan hingga kering. Selanjutnya, sampel diperiksa di bawah mikroskop elektron. *Potyvirus* akan tampak sebagai partikel yang berbentuk batang, lentur dan berukuran 700–900 nm (DAMAYANTI dan PUTRA, 2011). Uji RT-PCR ditujukan untuk mendeteksi virus *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). Isolasi RNA total dari sampel tanaman tebu dilakukan dengan menggunakan *Rneasy Plant Mini Kit* (Qiagen). RNA hasil ekstraksi kemudian digunakan sebagai *template* untuk membentuk DNA komplementer (cDNA) menggunakan *RevertAid cDNA synthesis Kit* (*Thermo Science*). DNA komplementer yang terbentuk selanjutnya digunakan sebagai *template* untuk PCR menggunakan *Go Taq Green PCR kit* (KAPA) dengan primer spesifik SCSMV cpF dan SCSMV-AP3 dengan target pita berukuran 500 bp (Tabel 1). Campuran cDNA dan primer didenaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, kemudian reaksi dilanjutkan dengan 35 siklus pada 94°C-30 detik, 53°C-5 detik, dan 74°C-30 detik dengan tahapan akhir berupa perpanjangan untai DNA pada 74°C selama 5 menit. Hasil PCR divisualisasi pada agarose gel dan dielektroforesis di dalam buffer tris-boric acide-EDTA (TBE). Hasil elektroforesis dicat dengan etidium bromida.

Tabel 1. Urutan basa nitrogen dari primer yang digunakan untuk deteksi virus mosaik pada tanaman tebu.

Table 1. The nitrogen base sequences of primers used for mosaic virus detection on sugarcane.

Jenis Primer (Primers)	Sekuen Primer 5'–3' (Primer sequences 5'–3')	Posisi (position)	Ukuran (bp) (Size)	Referensi (References)
SCSMV cpF	GTGGGTTTCAGTTCTCGGTTCT-	Coat Protein	500	HEMA <i>et al.</i> (2003); DAMAYANTI dan PUTRA 2011
SCSMV-	TTTTTTCCTCCTCACGGGG			
AP3	CAGGTTGATTG			

### Termoterapi dan Khemoterapi yang Dikombinasikan dengan Kultur Apeks

Eksplan berupa tunas pucuk tebu disterilisasi kemudian ditanam pada media regenerasi (MS + *benzyladenine* (BA) 0,3 mg/l + *indole acetic acid* (IBA) 0,5 mg/l + *polyvinylpyrrolidone* (PVP) 300 mg/l). Subkultur dilakukan pada media yang sama untuk memacu multiplikasi tunas *in vitro*. Selanjutnya, sebanyak masing-masing 12 tunas *in vitro* yang berukuran sekitar 2 cm diberi perlakuan termoterapi pada suhu 25 (kontrol) dan 50°C menggunakan metode WATI *et al.* (2014). Apeks diisolasi di bawah mikroskop dan kemudian sebanyak masing-masing tiga apeks ditanam pada media yang mengandung Ribavirin 0 (kontrol) dan 25 µg/ml. Perlakuan diulang sebanyak empat kali. Eksplan diinkubasi selama 40 hari pada ruang kultur dengan suhu 25°C, pencahayaan 1000 lux, dan fotoperiodisitas 16 jam. Setelah itu, biakan disubkultur pada media regenerasi untuk pemulihan dan proliferasi tunas. Peubah yang diamati adalah persentase hidup, persentase tumbuh dan jumlah tunas yang dihasilkan dari setiap eksplan.

### Termoterapi dan Khemoterapi yang Dikombinasikan dengan Kultur Meristem

Tunas dari tanaman yang dikoleksi di rumah kaca disterilisasi dan kemudian diberi perlakuan termoterapi pada suhu 25 (kontrol) dan 50°C menggunakan metode Wati *et al.* (2014). Selanjutnya, sebanyak masing-masing 12 meristem diisolasi di bawah mikroskop dan ditanam pada media regenerasi (MS + BA 0,3 mg/l + IBA 0,5 mg/l + PVP 300 mg/l) yang mengandung Ribavirin 0 µg/ml (kontrol) dan 25 µg/ml. Perlakuan diulang sebanyak empat kali. Eksplan diinkubasi selama 40 hari pada ruang kultur dengan suhu 25°C, pencahayaan 1000 lux, dan fotoperiodisitas 16 jam. Setelah itu, biakan disubkultur pada media regenerasi untuk pemulihan dan proliferasi tunas.

Peubah yang diamati adalah persentase hidup, persentase tumbuh dan jumlah tunas yang dihasilkan dari setiap eksplan.

### Evaluasi Eliminasi Virus

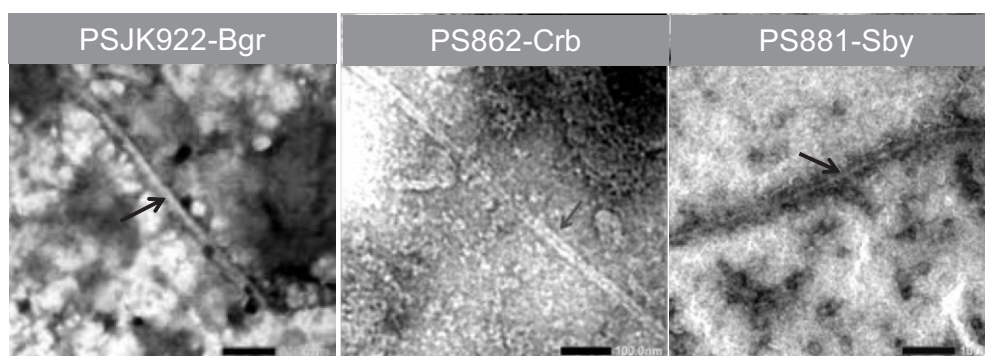
Sebanyak masing-masing satu botol biakan *in vitro* digunakan sebagai sampel untuk evaluasi eliminasi virus. Tunas-tunas *in vitro* yang berhasil beregenerasi pasca-perlakuan termoterapi atau khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur apeks atau kultur meristem dipilih sebagai sampel. Daun-daun *in vitro* dikumpulkan secara *bulk* dari masing-masing perlakuan. Evaluasi eliminasi virus dilakukan melalui uji TEM dan RT-PCR dengan tahapan yang sama dengan deteksi virus pada tanaman induknya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

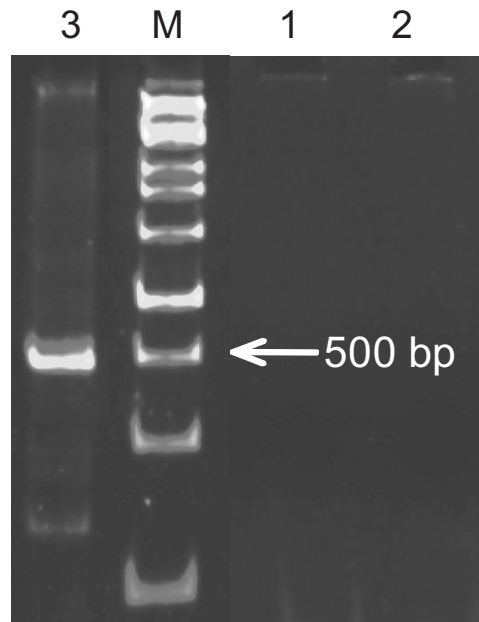
### Deteksi Virus dari Tanaman Induk

Hasil analisis TEM menunjukkan adanya partikel berbentuk batang dan lentur dengan ukuran sekitar 800 nm dijumpai pada semua sampel tanaman induk yang diuji (Gambar 1). Diduga bahwa sampel tersebut terinfeksi virus dari genus *Potyvirus*, karena dilaporkan bahwa virus-virus yang berbentuk filamen dan berukuran 700–900 nm dikelompokkan dalam genus *Potyvirus* (DAMAYANTI dan PUTRA, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2012; MARTELLI *et al.*, 2012).

Hasil analisis RT-PCR mengkonfirmasi bahwa satu sampel tebu, yaitu PS862-Crb, terbukti terinfeksi oleh virus SCSMV yang ditandai adanya pita DNA berukuran 500 bp menggunakan primer spesifik SCSMV (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan bahwa sampel tebu PS881-Sby dan PSJK922-Bgr terinfeksi oleh anggota genus *Potyvirus* atau genus lainnya yang berbentuk batang lentur.



Gambar 1. Profil TEM dari sampel tanaman induk tebu yang dikoleksi di rumah kaca.  
Figure 1. The profile of TEM assay of sugarcane mother plants collected in glass house.



Gambar 2. Hasil analisis RT-PCR dari sampel tebu tanaman induk dengan menggunakan primer spesifik SCSMV: PS881-Sby (1), PSJK922-Bgr (2), PS862-Crb (3), marka DNA (M). Pita yang tebal berukuran sekitar 500 bp menandakan adanya infeksi virus SCSMV.

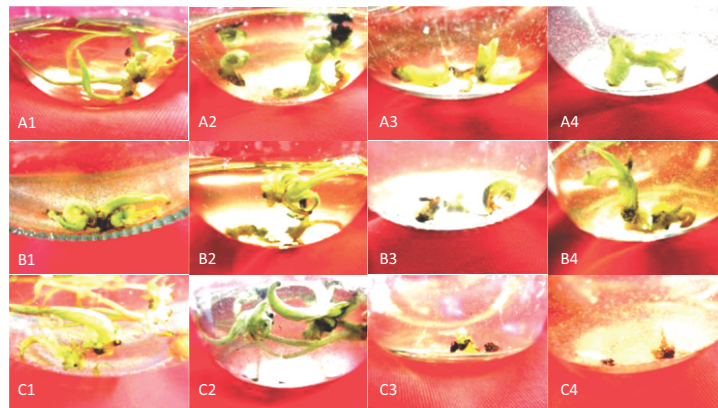
Figure 2. The result of RT-PCR assay of sugarcane mother plants by using specific primer of SCSMV: PS881-Sby (1), PSJK922-Bgr (2), PS862-Crb (3), DNA marker (M). The clear band with the size of 500 bp indicates the infection of SCSMV virus.

#### Aplikasi Termoterapi dan Khemoterapi yang Dikombinasikan dengan Kultur Apeks

Perbedaan respon *in vitro* dari ketiga varietas tebu yang diujikan telah diamati (Gambar 3), sehingga mengindikasikan adanya *genotype dependent*. Hasil percobaan menunjukkan bahwa apeks tebu PSJK922-Bgr dapat bertahan hidup dan tumbuh pasca-perlakuan termoterapi dan khemoterapi dengan persentase yang sama (Gambar 3) sehingga pembahasan ditekankan pada persentase tumbuh. Perlakuan termoterapi 50°C menyebabkan penurunan daya tumbuh apeks, sebaliknya perlakuan Ribavirin 25 µg/l tidak menurunkan daya tumbuh apeks, kecuali ketika dikombinasikan dengan perlakuan termoterapi 50°C. Perlakuan Ribavirin 25 µg/l menyebabkan peningkatan jumlah tunas. Kombinasi perlakuan termoterapi dan khemoterapi menghasilkan daya tumbuh 40% dengan jumlah tunas 5 tunas/eksplan. Respon yang agak berbeda ditunjukkan oleh PS862-Crb. Perlakuan tunggal

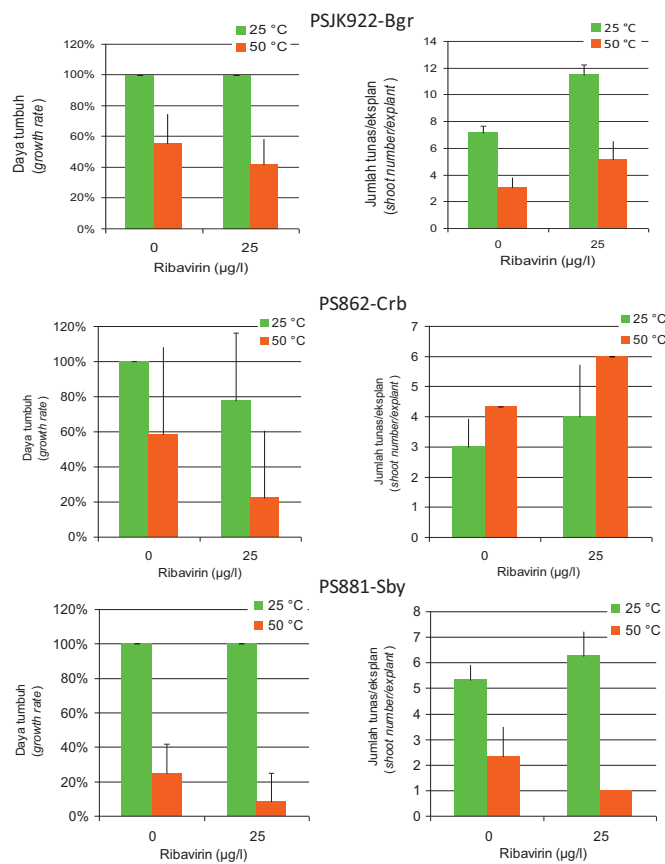
dari khemoterapi mampu menurunkan daya tumbuh apeks hingga mendekati 80%. Kombinasi termoterapi dan khemoterapi menyebabkan penurunan daya tumbuh hingga 20%, namun perlakuan termoterapi tersebut menyebabkan peningkatan jumlah tunas hingga 6 tunas/eksplan. PS881-Sby memberikan respon *in vitro* yang paling rendah karena perlakuan termoterapi 50°C menyebabkan penurunan daya tumbuh (hingga 22%) dan jumlah tunas (2 tunas/eksplan) sedangkan kombinasi perlakuan termoterapi dan khemoterapi menurunkan daya tumbuh hingga 10% dan jumlah tunas (4 tunas/eksplan) (Gambar 4). Hasil yang serupa juga dilaporkan oleh TORRES *et al.* (2000), perlakuan suhu termoterapi berpengaruh terhadap penurunan daya regenerasi tunas pucuk tanaman bawang putih. Ketika diberi perlakuan suhu 37°C maka daya regenerasi menurun menjadi 50%, sedangkan jika suhu ditingkatkan hingga 40°C maka daya regenerasi hanya mencapai 20%.





Gambar 3. Pertumbuhan apeks tebu 4 MST pasca-perlakuan termoterapi dan khemoterapi: PSJK922-Bgr (A), PS862-Crb (B), PS881-Sby (C), kontrol (1), Ribavirin 25 µg/l (2), suhu 50°C (3), serta kombinasi suhu 50°C dan Ribavirin 25 µg/l (4).

Figure 3. The growth of 4 MAP sugarcane apices after thermotherapy and chemotherapy treatments: PSJK922-Bgr (A), PS862-Crb (B), PS881-Sby (C), control (1), 25 µg/l Ribavirin (2), temperature 50°C (3), combined treatment of 50°C and 25 µg/l Ribavirin (4).



Gambar 4. Pengaruh perlakuan termoterapi dan khemoterapi terhadap daya tumbuh dan jumlah tunas dari apeks tebu PSJK922-Bgr, PS862-Crb, dan PS881-Sby pada 4 MST.

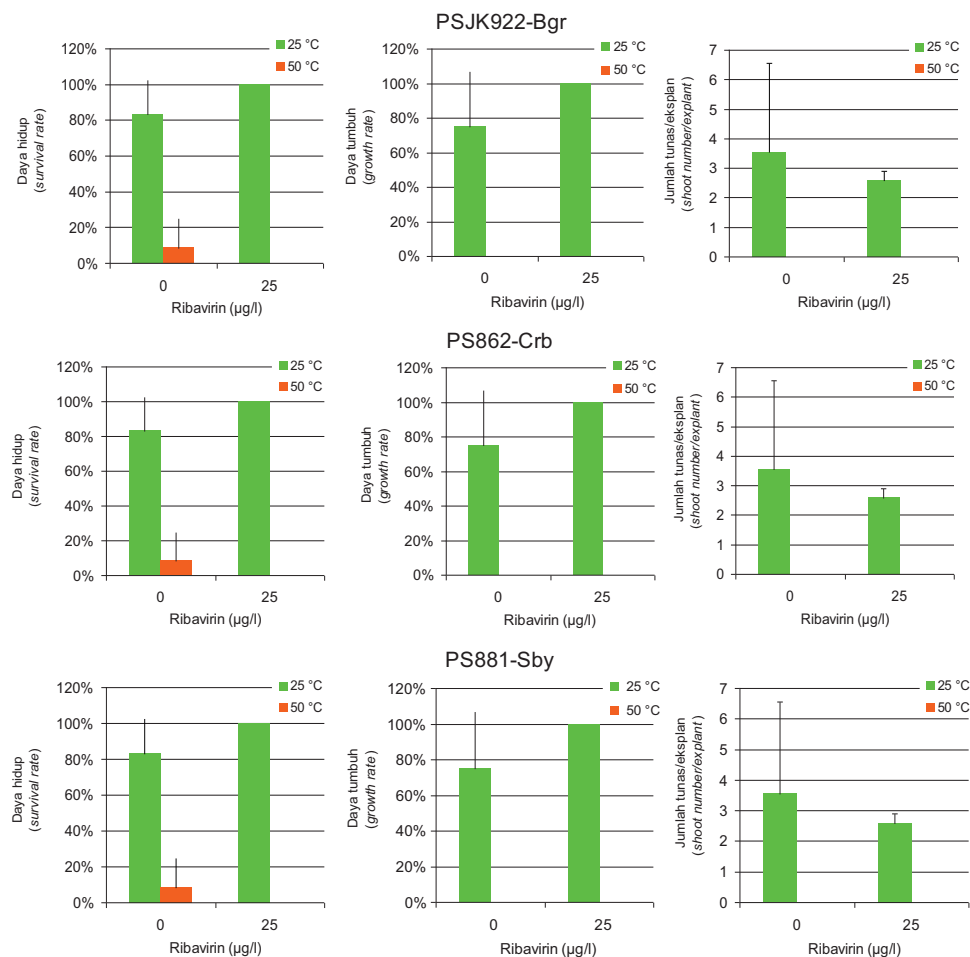
Figure 4. The effect of thermotherapy and chemotherapy treatment on the growth rate and shoot number of PSJK922-Bgr, PS862-Crb, and PS881-Sby sugarcane apices, 4 weeks after planting (WAP).

### Aplikasi Termoterapi dan Khemoterapi yang Dikombinasikan dengan Kultur Meristem

Berbeda dengan apeks, meristem memiliki respon *in vitro* yang lebih rendah dengan persentase hidup dan persentase tumbuh yang lebih rendah. Hal ini disebabkan ukuran meristem jauh lebih kecil daripada apeks. Kecilnya ukuran tersebut menyebabkan sulitnya isolasi meristem dan rawan mengalami kerusakan fisik dan mekanik. Selain itu, luka yang timbul pada saat isolasi dapat menyebabkan terjadinya pencoklatan oleh aktivitas enzim polifenol oksidase. Pencoklatan tersebut dapat menghambat proses regenerasi meristem karena bersifat fitotoksik. Oleh karena itu, di dalam media kultur ditambahkan PVP 300 mg/l untuk menekan terjadinya pencoklatan.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa meristem tebu PSJK922-Bgr memiliki daya hidup yang sangat rendah setelah perlakuan 50°C, yaitu kurang dari 10% dan

meristem tidak mampu beregenerasi lebih lanjut (Gambar 5). Sebaliknya, perlakuan Ribavirin 25 µg/l cenderung tidak menurunkan daya hidup, daya tumbuh dan jumlah tunas yang terbentuk dari meristem. Hingga 4 MST, meristem PSJK922-Bgr belum mampu beregenerasi membentuk tunas (Gambar 5). Meristem dari PS862-Crb mampu bertahan hidup pasca-perlakuan termoterapi atau khemoterapi. Kombinasi perlakuan termoterapi 50°C dan khemoterapi dengan Ribavirin 25 µg/l menghasilkan daya hidup 30%, daya tumbuh 10% dengan jumlah tunas 1 tunas/eksplan pada 4 MST (Gambar 5). Respon *in vitro* dari meristem PS881 asal Surabaya hampir sama dengan PS862 asal Cirebon. Kombinasi perlakuan termoterapi 50°C dan khemoterapi dengan Ribavirin 25 µg/l menghasilkan daya hidup dan daya tumbuh sekitar 10% dengan jumlah tunas 3 tunas/eksplan (Gambar 5).



Gambar 5. Pengaruh perlakuan termoterapi dan khemoterapi terhadap daya hidup dan daya regenerasi meristem tebu PSJK922-Bgr (A), PS862-Crb (B), dan PS881-Sby (C), 4 MST.

Figure 5. The effect of thermotherapy and chemotherapy treatment on the survival and regeneration rate of PSJK922-Bgr(A), PS862-Crb (B), dan PS881-Sby (C) sugarcane meristem, 4 WAP

### Evaluasi Eliminasi Virus

Hasil analisis TEM dari biakan yang diregenerasikan dari kultur apeks menunjukkan bahwa perlakuan termoterapi pada suhu 50°C hanya mampu mengeliminasi virus yang terdapat pada jaringan tebu PS881-Sby, sedangkan sampel PSJK922-Bgr dan PS862-Crb masih mengandung partikel virus (Gambar 6). Hasil uji RT-PCR menunjukkan bahwa perlakuan termoterapi dan khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur apeks belum mampu mengeliminasi virus SCSMV yang terdapat pada sampel PS862-Crb (Gambar 8). Berdasarkan MILOSEVIC *et al.* (2012), suhu inaktivasi virus adalah berbeda-beda, yaitu dengan rentang suhu 40-46°C untuk *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), namun ada yang mencapai 90°C untuk *Tobacco mosaic virus* (TMV).

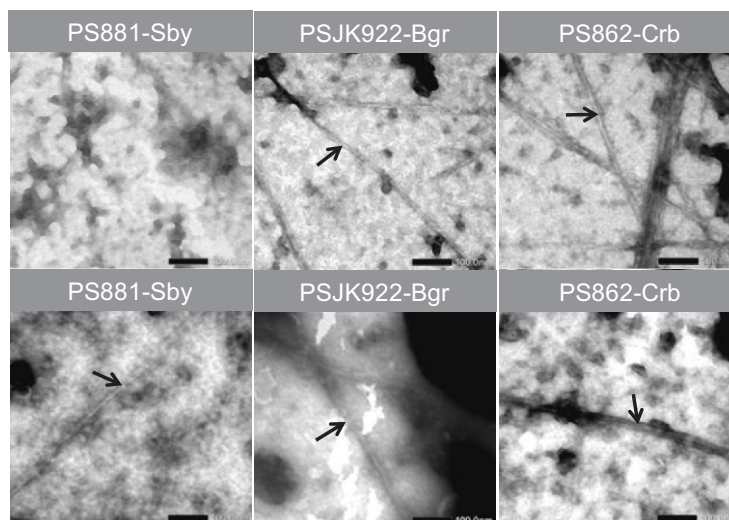
Hasil uji TEM menunjukkan untuk biakan yang diregenerasikan dari kultur meristem menunjukkan bahwa semua sampel yang diuji masih mengandung partikel virus yang berbentuk batang lentur, termasuk biakan yang berasal dari kombinasi perlakuan termoterapi dan kultur meristem (Gambar 7). Berbeda dengan hasil penelitian ini, TORRES *et al.* (2000) melaporkan bahwa perlakuan termoterapi atau kultur meristem yang diaplikasikan secara tunggal tidak dapat mengeliminasi virus pada bawang putih, namun ketika kedua perlakuan tersebut dikombinasikan maka eliminasi virus dapat terjadi. Eliminasi virus juga terjadi pada kentang yang diberi kombinasi perlakuan termoterapi dan kultur meristem (ALI *et al.*, 2013).

Hasil uji TEM menunjukkan untuk biakan yang diregenerasikan dari kultur meristem menunjukkan bahwa semua sampel yang diuji masih mengandung partikel virus yang berbentuk batang lentur, termasuk biakan yang berasal dari kombinasi perlakuan termoterapi dan kultur meristem (Gambar 7). Berbeda dengan hasil penelitian ini, TORRES *et*

*al.* (2000) melaporkan bahwa perlakuan termoterapi atau kultur meristem yang diaplikasikan secara tunggal tidak dapat mengeliminasi virus pada bawang putih, namun ketika kedua perlakuan tersebut dikombinasikan maka eliminasi virus dapat terjadi. Eliminasi virus juga terjadi pada kentang yang diberi kombinasi perlakuan termoterapi dan kultur meristem (ALI *et al.*, 2013).

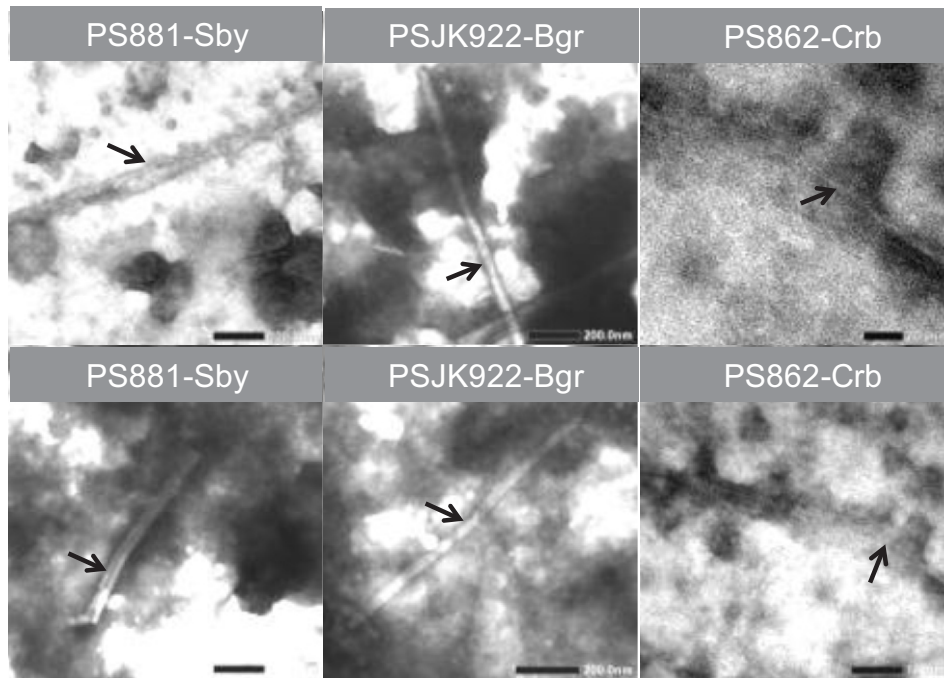
Berbeda dengan hasil uji TEM, uji RT-PCR menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan kultur meristem dan khemoterapi dapat mengeliminasi virus SCSMV yang terdapat pada sampel PS862-Crb (Gambar 8). Dilaporkan bahwa Ribavirin merupakan nukleosida sintetik yang analog dengan guanosisin dan memiliki inhibitor inosin monofosfat dehidrogenase (IMPDH) yang mempunyai aktivitas antiviral untuk menghambat replikasi virus (PANATTONI *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini, partikel virus yang masih teramati secara TEM kemungkinan merupakan spesies virus lain yang tidak dominan pada tebu atau virus *mild strain* yang tidak merugikan secara ekonomi dan tidak menimbulkan gejala pada tanaman tebu. Disarankan untuk melakukan indeksing terhadap sampel tebu dalam jumlah yang lebih besar untuk menentukan tingkat efikasi metode eliminasi virus tersebut. Terdapat beberapa alasan yang menjelaskan mengapa virus dapat tereliminasi setelah perlakuan kultur meristem, yaitu (1) meristem memiliki aktivitas metabolik yang tinggi sehingga dapat menghambat replikasi virus, (2) tidak adanya vaskularisasi di daerah meristem sehingga menghambat pergerakan virus, (3) kandungan auksin yang tinggi di daerah meristem sehingga replikasi virus menjadi terhambat, dan (4) meristem lolos dari infeksi virus disebabkan oleh mekanisme pembungkaman RNA (*RNA silencing*): RNS virus menjadi target inaktivasi oleh fragmen antisense RNA (GONCALVES *et al.*, 2012).



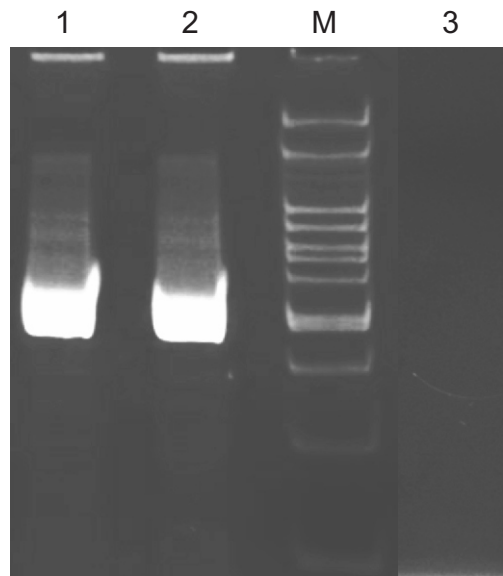
Gambar 6. Profil TEM dari sampel tebu yang diregenerasikan dari kultur apeks pasca perlakuan termoterapi pada suhu 50°C (baris atas) dan khemoterapi dengan Ribavirin 25 µg/l (baris bawah).

Figure 6. The profile of TEM assay of sugarcane cultures regenerated from apices after thermotherapy with temperature of 50°C (upper row) and chemotherapy with 25 µg/l Ribavirin (lower row).



Gambar 7. Profil TEM dari sampel tebu yang diregenerasikan dari kultur meristem pasca-termoterapi pada suhu 50°C (baris atas) dan pasca-khemoterapi dengan Ribavirin 25 µg/l (baris bawah).

Figure 7. The profile of TEM assay of sugarcane cultures regenerated from meristems after thermotherapy with temperature of 50°C (upper row) and chemotherapy with 25 µg/l Ribavirin (lower row).



Gambar 8. Hasil uji RT-PCR dari sampel tebu PS862-Crb pasca-perlakuan termoterapi dan khemoterapi: marka (M), kultur apeks diikuti dengan termoterapi pada suhu 50°C (1), kultur apeks diikuti dengan khemoterapi menggunakan Ribavirin 25 µg/l (2), dan kultur meristem diikuti dengan khemoterapi menggunakan Ribavirin 25 µg/l (3).

Figure 8. The result of RT-PCR assay of PS862-Crb sugarcane after thermotherapy and chemotherapy treatment: marker (M), thermotherapy at 50°C followed by apex culture (1), apex culture followed by chemotherapy with 25 µg/l Ribavirin (2), and meristem culture followed by chemotherapy with 25 µg/l Ribavirin (3).



## KESIMPULAN

Uji TEM berhasil mendeteksi adanya partikel virus yang berbentuk batang lentur, dan berukuran sekitar 800 nm dari tiga sampel tebu, yaitu PSJK922-Bgr, PS862-Crb, dan PS881-Sby. Uji RT-PCR hanya dapat mendeteksi infeksi virus SCSMV dari sampel tebu PS862-Crb; virus tersebut dapat dibebaskan melalui kombinasi perlakuan khemoterapi dengan Ribavirin 25 µg/l dan kultur meristem, tetapi perlakuan temoterapi dan khemoterapi yang dikombinasikan dengan kultur apeks tidak mampu mengeliminasi virus tersebut. Berdasarkan uji TEM, partikel Potyvirus masih terdeteksi tetapi diduga merupakan mild strain yang bersifat non patogenik.

## DAFTAR PUSTAKA

- ALAM, I., S.A. SHARMIN, M.K. NAHER, M.J. ALAM, M. ANISUZZAMAN, and M.F. ALAM. 2010. Effect of growth regulators on meristem culture and plantlet establishment in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Plant Omics Journal*. 3(2): 35-39.
- ALI, M.A., K.M. NASIRUDDIN, M.S. HAQUE, dan S.M. FAISAL. 2013. Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. *SAARC J. Agri.* 11(1): 71-80.
- ASNAWI A.H. 2009. Growth and Production of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) PS 864 Variety at Various Infection Level of Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV). Thesis. Universitas Brawijaya, Malang. 44 p.
- BAILEY R.A. 2004. Diseases. Dalam: James G. (ed). 2nd Edition. Sugarcane. Blackwell Science Ltd, Oxford. p.54-77.
- DAMAYANTI, T.A. and L.K. PUTRA. 2011. First occurrence of Sugarcane streak mosaic virus infecting sugarcane in Indonesia, *J Gen Plant Pathol*. 77: 72-74.
- GONÇALVES, M.C., L.R. PINTO, S.C. SOUZA, and M.G.A. LANDELL. 2012. Virus Disease of Sugarcane. A Constant Challenge to Sugarcane Breeding in Brazil.
- HEMA, M., N. KIRTHI, P. SREENIVASULU, and H.S. SAVITHRI. 2003. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR for detection and discrimination of sugarcane streak mosaic virus isolates from Southern India. *Arch Virol*. 148(6): 1185-93.
- HU, G.J., N. HONG, L.P. WANG, H.J. HU, and G.P. WANG. 2012. Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy, *Crop Protection*. 37: 20-25
- KRISTINI, A., E.M. ACHADIAN, IRAWAN, L.K. PUTRA, T. DIANPRATIWI, M. MULYADI, dan MURWANDONO. 2008. Potret penyakit tebu di Jawa: Distribusi dan dominasi penyakit-penyakit tebu penting, *MPG*. 44(4): 205-218.
- MAHARLIKA, F.P.P. 2009. Pengaruh Perlakuan Air Panas untuk Mengurangi Intensitas SCSMV (*Sugarcane streak mosaic virus*) pada Bibit Tebu (*Saccharum officinarum* L) Varietas PS 864 [skripsi]. Malang (ID): Universitas Brawijaya. 32 hlm.
- MARTELLI, G.P., N.A.G. SABANADZOVIC, A.A. AGRANOVSKY, M. AL RWAHNIH, V.V. DOLJA, C.I. DOVAS, M. FUCHS, P. GUGERLI, J.S. HU, W. JELKMANN, N.I. KATIS, V.I. MALIOGKA, M.J. MELZER, W. MENZEL, A. MINAFRA, M.E. ROTT, A. ROWHANI, S. SABANADZOVIC, P. and SALDARELLI. 2012. Taxonomic Revision of The Family *Closteroviridae* with Special Reference to The *Grapevine Leafroll*-Associated Members of The Genus *Ampelovirus* and The Putative Species Unassigned to The Family. *Journal of Plant Phytopathology*. 94(1).
- MILOŠEVIĆ S., A. CINGEL, S. JEVREMOVIĆ, I. STANKOVIĆ, A. BULAJIĆ, B. KRSTIĆ, and A. SUBOTIĆ. 2012. Virus elimination from ornamental plants using in vitro culture techniques. *Pestic. Phytomed.* (Belgrade). 27(3): 203-211.
- PANATTONI, A., A. LUVISI, and E. TRIOLO. 2013. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 11(1): 173-188.
- PUTRA, L.K. dan T.A. DAMAYANTI. 2009. Penyakit *streak mosaic* pada tebu di Indonesia: survei lapang, deteksi virus, uji penularan, kisaran inang, dan ketahanan varietas. *MPG*. 45(1): 19-35.
- RAMGAREEB, S., S.J. SNYMAN, T.V. ANTWERPEN, and R.S. RUTHERFORD. 2010. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 100: 175-181.
- RETHEESH, S.T. and A.I. BHAT. 2010. Simultaneous elimination of cucumber mosaic virus and cymbidium mosaic virus infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. *Crop Protection*. 29: 1214-1217.
- ROOSTIKA, I., R.P.D.L. WATI, dan D. SUKMADAJA. 2015. Pengaruh PVP dan DIECA terhadap pertumbuhan meristem tebu. *Buletin Tanaman Serat*. 17(1): 9-14.
- TORRES, A.C., T.V. FAJARDO, A.N. DUSI, R. DE OLIVEIRA RESENDE, and J.A. BUSO. 2000. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free plants of garlic. *Horticultura Brasileira*. 18(3): 192-195.
- WANG, Q. and VALKONEN J.P.T. 2012. Cryopreservation of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Science*. 14(3): 119-122.

WANG, Q., and J.P.T. VALKONEN. 2008. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. Trends in Plant Science. 14(3): 119-122.

WATI, R.P.D.L, D. SUKMADAJA, D. EFENDI, dan I. ROOSTIKA. 2014. Pengaruh perlakuan air panas terhadap pertumbuhan apeks tebu. Jurnal Littri 20(4): 169-178.